

Rec'd PCT/PTC 02 JUL 2004

PCT/JP 03/CG113

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

09.01.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 1月11日

出願番号

Application Number:

特願2002-005180

[ST.10/C]:

[JP2002-005180]

出願人

Applicant(s):

武田薬品工業株式会社

REC'D 07 MAR 2003

WIPO

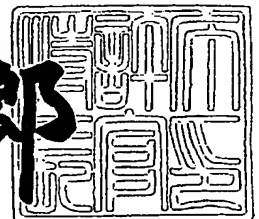
PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3008095

【書類名】 特許願

【整理番号】 B02016

【提出日】 平成14年 1月11日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府松原市一津屋4丁目3番26号

    【氏名】 山田 隆央

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府箕面市瀬川5丁目13-27-102

    【氏名】 辻 勇

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県川西市松が丘町6-3

    【氏名】 三角 裕子

【特許出願人】

    【識別番号】 000002934

    【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100114041

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 高橋 秀一

【選任した代理人】

    【識別番号】 100110456

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 内山 務

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 005142

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9909276

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】K i S S - 1 ペプチドの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】N 末端にシステインを有する低分子ペプチドの N 末端に、K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とする K i S S - 1 ペプチドまたはその塩の製造法。

【請求項 2】N 末端にシステインを有する低分子ペプチドの N 末端に、K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードする DNA を有するベクターを保持する形質転換体を培養して融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を発現させ、発現された融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とする K i S S - 1 ペプチドまたはその塩の製造法。

【請求項 3】K i S S - 1 ペプチドの C 末端がアミドである請求項 1 または 2 記載の製造法。

【請求項 4】切断反応が S - シアノ化反応、次いでアンモノリシスまたは加水分解反応に付す反応である請求項 1 または 2 記載の製造法。

【請求項 5】K i S S - 1 ペプチドが配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドである請求項 1 または 2 記載の製造法。

【請求項 6】K i S S - 1 ペプチドが、①配列番号：1 で表されるアミノ酸配列の N 末端から第 4 0 ～ 5 4 番目からなるアミノ酸配列を有するペプチド、②配列番号：1 で表されるアミノ酸配列の N 末端から第 4 5 ～ 5 4 番目からなるアミノ酸配列を有するペプチド、③配列番号：1 で表されるアミノ酸配列の N 末端から第 4 6 ～ 5 4 番目からなるアミノ酸配列を有するペプチドまたは④配列番号：1 で表されるアミノ酸配列の N 末端から第 4 7 ～ 5 4 番目からなるアミノ酸配列を有するペプチドである請求項 1 または 2 記載の製造法。

【請求項 7】N 末端にシステインを有する低分子ペプチドが、N 末端にシステインを有し、約 1 0 ～ 約 5 0 個のアミノ酸残基からなるペプチドである請求項 1 または 2 記載の製造法。

【請求項 8】 N末端にシステインを有する低分子ペプチドが、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有し、そのN末端にシステイン残基が付加したペプチドである請求項 1 または 2 記載の製造法。

【請求項 9】 N末端にシステインを有する低分子ペプチドが配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有し、そのN末端にシステイン残基が付加したペプチドであり、K i S S - 1 ペプチドが配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドであり、製造されるK i S S - 1 ペプチドがC末端がアミドである配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである請求項 1 または 2 記載の製造法。

【請求項 10】 N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端に、K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩。

【請求項 11】 配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を含有する請求項 10 記載の融合蛋白質、ペプチドまたはその塩。

【請求項 12】 請求項 10 記載の融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを含有するDNA。

【請求項 13】 ①配列番号：6で表される塩基配列または②配列番号：7で表される塩基配列を有する請求項 12 記載のDNA。

【請求項 14】 請求項 12 記載のDNAを有するベクター。

【請求項 15】 請求項 14 記載のベクターを含有する形質転換体。

【請求項 16】 F E R M B P - 7 8 2 3 で表示されるエシュリヒア・コリMM 2 9 4 ( D E 3 ) / p T C 2 M e t C 2 4 - 1 . 3 。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端に、K i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはポリペプチドを製造し、次いで該融合蛋白質またはポリペプチドをペプチド結合の切断反応に付すことにより、K i S S - 1 ペプチドまたはその塩を製造する方法に関する。

【0002】

## 【従来の技術】

遺伝子組換え技術を用いて、ペプチドを製造するに際しては、ペプチドが細胞内で、分解を受けやすいために、融合蛋白質の形で発現させることがしばしば行なわれている。融合蛋白質からの目的ペプチドの切り出しには、ブロムシアンを用い化学的に切断する方法（イタクラら、Science, 198, 1056(1977))、ファクターXaを用い酵素的に切断する方法（ナガイら、Methods in Enzymology, 153, 46(1987)) が知られている。

さらに、蛋白質中のペプチド結合を切断する方法として、2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸によるアシルシステイン結合の切断が知られている（「生化学実験講座」1, タンパク質の化学II, 日本生化学会編, 東京化学同人発行, 第247～250頁1976年）。しかしながら、蛋白質からの目的ペプチドの切り出しについては、開示されていない。

WO00/24890号には、本発明で用いられるKiSS-1ペプチドまたはその塩が開示されている。

WO01/44469号には、N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドのN末端に、KiSS-1ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とするKiSS-1ペプチドまたはその塩の製造法が開示されており、N末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドとして、インターフェロン類、インターロイキン類、線維芽細胞成長因子（aFGF、bFGF）等各種成長因子類、（プロ）ウロキナーゼ類、リンホトキシン、Tumor Necrosis Factor(TNF)、 $\beta$ -ガラクトシターゼなどの酵素タンパク類、貯蔵タンパク類、ストレプトアビシン、プロテインA、プロテインG、Tissue Plasminogen Activator(TPA)、これらのムテイン又はこれらの一部（断片）が例示されている。

## 【0003】

## 【発明が解決しようとする課題】

従来知られている技術において、融合蛋白質からの目的ペプチドの切り出しに際し、ブロムシアンを用いる場合には、メチオニンを含むペプチドの製造には適用することはできないし、切り出し時の収率等に問題が多い。

このように、融合蛋白質またはポリペプチドから目的とするペプチドを効率良く切り出す方法が望まれている。

#### 【0004】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、新規生理活性ペプチドであるKiSS-1ペプチドまたはその塩を効率良く製造する方法について鋭意検討を加えたところ、N末端にシステインを有する低分子のペプチドのN末端に、KiSS-1ペプチドを連結した融合蛋白質またはポリペプチドを製造し、次いでこれをペプチド結合を切断する反応に付すことにより、KiSS-1ペプチドまたはその塩を効率良く製造できることを見い出した。

#### 【0005】

本発明は、

(1) N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端に、KiSS-1ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とするKiSS-1ペプチドまたはその塩の製造法、

(2) N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端に、KiSS-1ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを有するベクターを保持する形質転換体を培養して融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を発現させ、発現された融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とするKiSS-1ペプチドまたはその塩の製造法、

(3) KiSS-1ペプチドのC末端がアミドである上記(1)または(2)記載の製造法、

(4) 切断反応がS-シアノ化反応、次いでアンモノリシスまたは加水分解反応に付す反応である上記(1)または(2)記載の製造法、

(5) KiSS-1ペプチドが配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドである上記(1)または(2)記載の製造法、

(6) KiSS-1ペプチドが、①配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末

端から第40～54番目からなるアミノ酸配列を有するペプチド、②配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第45～54番目からなるアミノ酸配列を有するペプチド、③配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第46～54番目からなるアミノ酸配列を有するペプチドまたは④配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第47～54番目からなるアミノ酸配列を有するペプチドである上記（1）または（2）記載の製造法、

（7）N末端にシステインを有する低分子ペプチドが、N末端にシステインを有し、約10～約50個のアミノ酸残基からなるペプチドである上記（1）または（2）記載の製造法、

（8）N末端にシステインを有する低分子ペプチドが、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有し、そのN末端にシステイン残基が付加したペプチドである上記（1）または（2）記載の製造法、

（9）N末端にシステインを有する低分子ペプチドが配列番号：3で表されるアミノ酸配列を含有し、そのN末端にシステイン残基が付加したペプチドであり、KiSS-1ペプチドが配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドであり、製造されるKiSS-1ペプチドがC末端がアミドである配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである上記（1）または（2）記載の製造法、

（10）N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端に、KiSS-1ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩、

（11）配列番号：5で表わされるアミノ酸配列を含有する上記（10）記載の融合蛋白質、ペプチドまたはその塩、

（12）上記（10）記載の融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを含有するDNA、

（13）①配列番号：6で表される塩基配列または②配列番号：7で表される塩基配列を有する上記（12）記載のDNA、

（14）上記（12）記載のDNAを有するベクター、

（15）上記（14）記載のベクターを含有する形質転換体、および

（16）FERM BP-7823で表示されるエシュリヒア・コリMM294



(DE3) / pTC2MetC24-1.3を提供する。

さらに、本発明は、

(17) 次の①～④の工程；

①N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端システインに、KiSS-1ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを作製する、

②該DNAを有するベクターを作製する、

③該ベクターを保持する形質転換体を培養して融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を発現させる、

④発現された融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付す、

からなる第(2)項記載の製造法、

(18) N末端にシステインを有する低分子ペプチド(ここで低分子ペプチドとは、目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドをいう)のN末端に、目的成熟ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とする目的成熟ペプチドまたはその塩の製造法、

(19) N末端にシステインを有する低分子ペプチド(ここで低分子ペプチドとは、目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドをいう)のN末端に、目的成熟ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを有するベクターを保持する形質転換体を培養して融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を発現させ、発現された融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とする目的成熟ペプチドまたはその塩の製造法、

(20) 切断反応がS-シアノ化反応、次いでアンモノリシスまたは加水分解反応に付す反応である上記(18)または(19)記載の製造法、

(21) 目的成熟ペプチドが約10～100個のアミノ酸残基を含有するペプチドである上記(18)または(19)記載の製造法、

(22) N末端にシステインを有する低分子ペプチドが、N末端にシステインを

有し、約10～約50個のアミノ酸残基からなるペプチドである上記(18)または(19)記載の製造法、

(23) N末端にシステインを有する低分子ペプチド(ここで低分子ペプチドとは、目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドをいう)のN末端に、目的成熟ペプチドを連結した融合蛋白質、ペプチドまたはその塩、

(24) 上記(23)記載の融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを含有するDNA、

(25) 上記(24)記載のDNAを有するベクター、

(26) 上記(25)記載のベクターを含有する形質転換体、

(27) 次の①～④の工程；

①N末端にシステインを有する低分子ペプチド(ここで低分子ペプチドとは、目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドをいう)のN末端システインに、目的成熟ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを作製する、

②該DNAを有するベクターを作製する、

③該ベクターを保持する形質転換体を培養して融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を発現させる、

④発現された融合蛋白質、ペプチドまたはその塩を該システイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付す、

からなる第(19)項記載の製造法を提供する。

#### 【0006】

本発明の方法に用いられるKiSS-1ペプチドとしては、例えばWO00/24890号に記載のヒトKiSS-1ペプチドが用いられ、具体的には、本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドなどがあげられる。

「本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列を含有し、8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチド」としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第4

7～54番目のアミノ酸配列を含有し、かつ8乃至54個のアミノ酸残基からなるペプチドであればいかなるものであってもよいが、ペプチド活性（例えば、ペプチドと受容体の結合活性、ペプチドによって引き起こされる受容体発現細胞の細胞刺激活性など）などが、実質的に同じであることを意味する。具体的には、①本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列で表されるペプチド、②本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、N末端から第47～54番目のアミノ酸配列をC末端に有し、8乃至15個のアミノ酸残基からなるペプチドなどが用いられる。

より具体的には、K i S S - 1 ペプチドとしては、①本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列で表されるペプチド、②本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第40～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチド、③本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第45～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチド、④本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第46～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチド、⑤本願の配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から第47～54番目からなるアミノ酸配列で表されるペプチドなどがあげられる。

上記K i S S - 1 ペプチドは、W O O O / 2 4 8 9 0 号に記載のレセプター蛋白質O T 7 T 1 7 5 に対し、リガンド活性を有する。

本明細書におけるペプチドはペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表されるペプチドのC末端は、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）、カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アルキルアミド（ $-\text{CONHR}$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。エステルまたはアルキルアミドのRとしては、例えばメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル、もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキルなどの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるジバニールオキシメチル基などがあげられる。

本発明のK i S S - 1 ペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明の方法に用いられるN末端にシステインを有する蛋白質またはペプチドとしては、特定されるものではない。そのN末端にシステインを有しない蛋白質またはペプチドの場合は、自体公知の方法によりN末端にシステインを有するようにすればよい。

#### 【0007】

該N末端にシステインを有する低分子ペプチドとしては、例えば約10～50個、好ましくは約20～40個、さらに好ましくは約20～30個アミノ酸残基を有するものが好ましい。なかでも、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するK i S S - 1 ペプチド成熟体（例えば、J. Natl. Cancer Inst., 88, 1731, 1996；WO98/39448号）の断片ペプチドなどが用いられ、なかでもK i S S - 1 ペプチド成熟体のC末端側の断片ペプチドが好ましい。

より好ましくは、該低分子ペプチドとしては、例えば、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するK i S S - 1 ペプチド成熟体のC末端側の断片ペプチドなどが好ましく用いられる。

#### 【0008】

本発明方法で用いられる融合蛋白質（融合ペプチドを含む）をコードするDNAは、（1）全塩基配列を化学的に合成してもよいし、（2）低分子ペプチドをコードする塩基配列のN末端側にシステインをコードする塩基配列を配置し、さらにそのN末端側にK i S S - 1 ペプチドをコードする塩基配列を配置することにより該DNAを構築してもよい。また、（3）該ペプチドのフラグメントを得るのが目的の場合には、所望のフラグメントの直後のアミノ酸残基をsite-directed mutagenesis等の手法でシステインに置換した該DNAを構築すればよい。

上記の(1)の場合の製造法としては、例えば、自体公知のホスホアミダイド法、リン酸トリエステル法、ジエステル法、ハイドロジェンホスホネート法などを用いて、短いものなら一度に、長いものでは分割して合成した後にT4 DNAリガーゼを用いて連結して作成することが可能である。

## 【0009】

上記の(2)の場合の製造法としては、例えば、C末端側の蛋白質をコードするDNAは、染色体またはcDNAから適当な制限酵素で切断し、ベクターに連結して得るか、もしくはcDNAを取得する。しかる後にN末端がシステインになるように制限酵素で切断するか、もしくは、合成DNAを全蛋白もしくはその一部の遺伝子の5'-末端に結合しN末端がシステインになるように改変する。その5'-末端に目的の蛋白質をコードするDNA(化学合成したものでも、生体よりクローニングしてきたものでもよい)をつなげる。

このようにして得られる融合蛋白質をコードするDNAの具体例としては、例えば式

GGTACTTCTCTGTCTCCGCCGCCGGAATCTTCTGGTTCTCGTCAGCAGCCGGGTCTGTCTGCTCCGCACTCT  
CGTCAGATCCCGGCTCCGCAGGGTGCTGTTCTGGTTCAGCGTGAAAAAGACCTGCCGAACACTACAAC  
TCTTTCGGTCTGCGTTTC (配列番号：2) -TGC または TGT-R (I)

〔式中、Rは配列番号：4で表わされる塩基配列を示す。〕で表わされる塩基配列(配列番号：6または7)を含有するDNAなどがあげられる。

## 【0010】

上記式(I)はヒト(human) KiSS-1ペプチドを含有するペプチドをコードするDNA塩基配列(配列番号：2)にシステインをコードする塩基配列(TGCまたはTGT)を介してRで示される塩基配列(配列番号：4)が結合していることを示す。

KiSS-1ペプチドをコードするDNAは、上記式(I)で表されるDNAや配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するKiSS-1ペプチド成熟体をコードするDNAまたはその改変DNA(例えば、J. Natl. Cancer Inst., 88, 1731, 1996; WO 98/39448号)を用いて、自体公知の方法に従って製造することもできる。

5'末端にATGを有し、その下流に該融合蛋白質をコードする領域、ついで翻訳終止コドンを含むDNA(プラスミド)は、化学合成で、あるいは遺伝子工学的に製造された公知の該蛋白質のcDNA、もしくは、染色体由来の該蛋白質のDNAを加工することにより製造することができる。

本発明のN末端にシステインを含む低分子ペプチドのN末端にKISS-1ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをコードするDNAを、従来のDNA技術、例えば特定部位指向性変異誘発技術を用いて目的のムチンをコードするDNAに変換することができる。

特定部位指向性変異誘発技術は周知であり、アール・エフ・レイサー(Lather, R. F.)及びジェイ・ピー・レコック(Lecoq, J. P.)、ジェネティック・エンジニアリング(Genetic Engineering)、アカデミックプレス社(1983年)第31-50頁に示されている。オリゴヌクレオチドに指示された変異誘発はエム・スミス(Smith, M.) 及びエス・ギラム(Gillam, S.)、ジェネティック・エンジニアリング：原理と方法、プレナムプス社(1981年)3巻 1-32頁に示されている。

#### 【0011】

該融合蛋白質をコードする領域を含むDNAを含むプラスミドを製造するにあたって、ベクターとして用いられるプラスミドとしては、例えば大腸菌(*Escherichia coli*) 由来のpBR322 [ジーン(Gene), 2, 95(1977)], pBR313 [ジーン, 2, 75(1977)], pBR324, pBR325 [ジーン, 4, 124(1978)], pBR327, pBR328 [ジーン, 9, 287(1980)], pBR329 [ジーン, 17, 79(1982)], pKY2289 [ジーン, 3, 1(1978)], pKY 2700 [生化学, 52, 770(1980)], pACYC177, pACYC184 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー(Journal of Bacteriology), 134, 1141(1978)], pRK248, pRK646, pDF [メソッズ・イン・エンジモロジー(Methods in Enzymology), 68, 268(1979)], pUC18, pUC19 [ヤニシューペロンら, ジーン(Gene), 33, 103(1985)] などがあげられる。また、バクテリオファージ、例えばλファージを使用したλgt系のλgt・λC [Proc.

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4579(1974)],  $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ B [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3461(1975)],  $\lambda$ Dam [ジーン, 1, 255(1977)] やシャロンベクター [サイエンス, (Science), 196, 161(1977); ジャーナル・オブ・ビーロロジ (Journal of Virology), 29, 555(1979)], 繊維状ファージを使用したmp系のmp18, mp19 [ヤニシューペロンら, ジーン(Gene), 33, 103(1985)] ベクターなどもあげられる。

## 【0012】

上記DNAは、ATGの上流にプロモーターを有しているのが好ましく、該プロモーターは、形質転換体の製造に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

例えば大腸菌(*Escherichia coli*)ではtrpプロモーター, lacプロモーター, rec Aプロモーター,  $\lambda$ PLプロモーター, lppプロモーター, T7プロモーターなど、枯草菌(*Bacillus subtilis*)ではSPO1プロモーター, SPO2プロモーター, penPプロモーターなど、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)ではPHO5プロモーター, PGKプロモーター, GAPプロモーター, ADHプロモーターなど、動物細胞ではSV40由来のプロモーターなどがあげられる。必要によりSD(シャインアンドダルガーノ)配列をプロモーターの下流に挿入してもよい。

T7プロモーターの系を用いる場合には、T7プロモーターとしては、T7DNA上で見い出されている17種のプロモーター [J. L. Oakley ら, Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A, 74:4266-4270(1977), M. D. Rosa, Cell 16:815-825(1979), N. Panayotatos ら, Nature, 280:35(1979), J. J. Dunn ら, J. Mol. Biol., 166:477-535(1983)] のいずれでもよいが $\phi$ 10プロモーター [A. H. Rosenberg ら, Gene, 56:125-135(1987)] が好ましい。

## 【0013】

転写ターミネーターとしては、大腸菌の系で作動するターミネーター、好ましくはT $\phi$ ターミネーター [F. W. Studier ら, J. Mol. Biol., 189:113

-130(1986)] が用いられる。

T7RNAポリメラーゼ遺伝子としてはT7遺伝子 [F. W. Studier ら, J. Mol. Biol., 189: 113-130(1986)] をあげることが出来る。

ベクターは上記ベクターにT7プロモーター, T7ターミネーターを組み込んで構築されるのが好ましく、このようなベクターとしては、pET-1, pET-2, pET-3, pET-4, pET-5 [A. H. Rosenberg, Gene 56: 125-135(1987)]、pTB960-2 [EP-A-499990]などをあげることができるが、好ましくはpTB960-2が用いられる。

#### 【0014】

本発明の形質転換体は、上記方法で得られる発現用プラスミドを自体公知の方法 [例、コーエンS, N, ら, プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69, 2110(1972)] で宿主を形質転換することにより製造することができる。

形質転換される微生物の宿主としては、例えば、エシエリシア(Escherichia)属菌, バチリス(Bacillus)属菌, 酵母, 動物細胞などがあげられる。

上記エシエリシア属菌の例としては、エシエリシア・コリ(E. coli)があげられ、具体的にはエシエリシア・コリ(Escherichia coli)K12DH1 [プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 60, 160(1968)], JM-103 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 120, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41, 459(1969)], C600 [ジェネティクス(Genetics), 39, 440(1954)], N4830 [セル(Cell), 25, 713(1981)], K-12MM294 [プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス, 73, 4174(1976)] BL-21などがあげられる。

#### 【0015】

上記バチルス属菌としては、例えばバチルス・サチルス(Bacillus subtilis)



があげられ、具体的にはバチルス・サチルスMI114(ジーン, 24, 255(1983)), 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry), 95, 87(1984)] などがあげられる。

上記酵母としては、例えばサッカロマイセス・セレビシアエ(Saccharomyces cerevisiae)があげられ、具体的には、サッカロマイセス・セレビシアエAH22 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978)], XSB52-23C [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 2173(1980)], BH-641A(ATCC 28339), 20B-12 [Genetics, 85, 23(1976)], GM3C-2 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2258(1981)] などがあげられる。

#### 【0016】

動物細胞としては、例えばサル細胞COS-7 [セル(Cell), 23, 175(1981)], Vero [(日本臨床 21, 1209(1963))], チャイニーズハムスター細胞CHO [ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Med.), 108, 945(1985)], マウスL細胞 [ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート(J. Nat. Cancer Inst.), 4, 165(1943)], ヒトFL細胞 [プロシーディングス・オブ・ザ・ソサエティ・フォー・エクスペリメンタル・バイオロジー・アンド・メディシン(Proc. Soc. Exp. Biol. Med.), 94, 532(1957)], ハムスターC細胞などがあげられる。

#### 【0017】

T7プロモーターの系を用いる場合には、その形質転換体の宿主としては、T7RNAポリメラーゼ遺伝子(T7遺伝子1) [F. W. Studierら, J. Mol. Biol. 189:113-130(1986)] を組み込んだ大腸菌株、例えばMM294, DH-1, C600, JM109, BL21, あるいはT7RNAポリメラーゼ遺伝子(T7遺伝子1)を他のプラスミドと共に組み込んだ大腸菌株などが用いられる。好ましくはT7遺伝子1を組み込んだλファージが溶原化したMM294株およびBL21株が用いられる。この場合T7遺伝子1のプロモーターとしては、イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド(IPTGと略す

ることがある。)で発現が誘導されるlacプロモーターが用いられる。

#### 【0018】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を宿主として形質転換するには、例えばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular and General Genetics), 168, 111(1979)など公知の方法に従って行なうことができる。

酵母菌を宿主として形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75, 1929(1978)などの公知の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を宿主として形質転換するには、例えば、ヴィーロロジー (Virology, 52, 456(1973)などの公知の方法に従って行なうことができる。

融合蛋白は、上述の形質転換体を培地に培養し、産生された融合蛋白を採取することにより製造することができる。

培地のpHは約6～8が望ましい。

#### 【0019】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [Miller, ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972)] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば3β-インドリル アクリル酸やイソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) のような薬剤を加えることができる。

#### 【0020】

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間

行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えばバークホルダー(Burkholder)最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA, 77, 4505(1980)] があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

#### 【0021】

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば約0.2～20%好ましくは約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス(Science), 122, 501(1952)] , DME培地 [ヴィロロジー(Virology), 8, 396(1959)] , RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association), 199, 519(1967)] , 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)] などがあげられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃、培養時間は約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

#### 【0022】

融合蛋白質は、上記形質転換体を培養し、培養物中に該融合蛋白質を生成、蓄積せしめ、これを採取することにより製造することができる。

培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー, J., エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス(Experiments in Molecular Genetics), 431-433 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972)] , 2×YT培地 [メシング, メソッド・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 101, 20(1983)] LB培地などがあげられる。

## 【0023】

培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えてもよい。

$\lambda$ cItsリプレッサーと、 $\lambda$ PLプロモーターを含有する発現ベクターとを有する組換え体を使用する場合には、培養は約15～36℃好ましくは約30℃～36℃の温度で行い、 $\lambda$ cItsリプレッサーの不活化は約37℃～42℃で行うのが好ましい。またrecAプロモーターをより効率良く働かせるため、すなわちrecA遺伝子発現抑制機能を低下せしめるため、必要によりマイトマイシンC、ナルジキシン酸などのような薬剤を添加したり、紫外線を照射する、あるいは培養液のpHをアルカリ側に変化させてもよい。

T7プロモーターの系を用いている場合には、(1)lacプロモーターの下流に連結されているT7遺伝子(RNAポリメラーゼ遺伝子)を発現させる時はIPTGなどを添加する、もしくは(2) $\lambda$ PLプロモーターの下流に連結されているT7遺伝子(RNAポリメラーゼ遺伝子)を発現させる時は培養の温度を上昇させることなどにより、生成するT7ファージRNAポリメラーゼ1により特異的にT7プロモーターを作動させる。

## 【0024】

培養後、公知の方法で菌体を集め、例えば緩衝液に懸濁したのち、例えば、蛋白変性剤処理、超音波処理やリゾチームなどの酵素処理、ガラスビーズ処理、フレンチプレス処理、凍結融解処理などを行って菌体を破碎し、遠心分離など公知の方法によって上清を得る。

上記により得られた上清から、融合蛋白質を単離するには、通常知られている蛋白質の精製法に従えばよい。例えば、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、電気泳動等を適切に組み合わせて行うことができる。また、該融合蛋白質は、精製することなく、あるいは部分精製の状態で、次の反応工程に進んでもよい。

次に、このようにして得られる融合蛋白質やペプチドをシステイン残基のアミノ基側のペプチド結合の切断反応に付す。該切断反応としては、例えば、S-シ

アノ化反応次いで加水分解反応があげられる。K i S S - 1 ペプチドのアミドまたはその塩を最終物として得る場合には、該切断反応としては、例えば、S - シアノ化反応次いでアンモノリシスを行うことがあげられる。該 S - シアノ化反応は、原料化合物に、S - シアノ化試薬を作用させることにより行なう。

## 【0025】

S - シアノ化試薬としては例えば 2 - ニトロ - 5 - チオシアノ安息香酸 (N T C B), 1 - シアノ - 4 - ジメチルアミノピリジウム塩 (D M A P - C N), C N - イオンなどがあげられる。該 S - シアノ化試薬の量は、モル数で全チオール基の約 2 倍から 50 倍量であればよく、好ましくは約 5 倍 ~ 10 倍量である。

反応温度は約 0℃ ~ 80℃ の間であれば、いずれでもよく、約 0℃ ~ 50℃ の間がより好ましい。用いる溶媒としては、S - シアノ化試薬と反応しないものであれば、いずれの緩衝液でもよいが、例えば、トリス - 塩酸緩衝液、トリス - 酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、などがあげられる。また、有機溶媒は、S - シアノ化試薬と反応しないものであれば、存在していてもよい。

該反応は、pH 1 ~ 12 の間で行なうのが良い。特に、N T C B を用いる場合には pH 7 ~ 10, D M A P - C N を用いる場合には S - S 交換反応を防止するため、pH 2 ~ 7 の間が好ましい。また、反応液中には、塩酸グアニジン等の変性剤が存在していてもよい。

## 【0026】

上記アンモノリシスまたは加水分解反応としては、例えばアルカリ処理に付すことがあげられる。

該アルカリ処理としては、原料化合物を含有する水溶液の pH を 7 ~ 14 に、調整することにより行なわれる。

該 pH の調整は、例えばアンモニア、水酸化ナトリウム、アミノ化合物、トリツマベース (トリス [ヒドロキシメチル] - アミノメタン), リン酸第 2 ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化バリウム等の溶液を原料化合物を含有する水溶液に適当量加えて行うが特にアンモニアなどが好ましい。

上記反応の際の溶液の濃度としては、たとえばアンモニアまたはアミノ化合物の場合は約 0.01 ~ 15 N 好ましくは約 0.1 ~ 3 N、水酸化ナトリウムの場合

は約0.01~2N好ましくは約0.05~1N、トリツマベースの場合は約1mM~1M好ましくは約20mM~200mM、リン酸第2ナトリウムの場合は約1mM~1M好ましくは約10mM~100mM、水酸化カリウムの場合は約0.01~4N好ましくは約0.1~2Nがあげられる。反応温度は約-20℃~80℃の間であればいずれでもよく、約-10℃~50℃の間がより好ましい。

## 【0027】

反応時間は、好ましくは、S-シアノ化反応は約1~60分好ましくは約15~30分が、加水分解反応は約5分~100時間好ましくは10分~15時間が、アンモノリシスは約5分~24時間好ましくは約10~180分があげられる。

該アミノ化合物としては、例えば、式  $R^1-(NR^2)-H$  (式中、 $R^1$  および  $R^2$  は同一または異なって、(i)水素原子、(ii) $C_{1-20}$ アルキル基、 $C_{3-8}$ シクロアルキル基、 $C_{6-14}$ アリール(aryl)基または $C_{6-14}$ アリール- $C_{1-3}$ アルキル基(これらは置換基を有していないかあるいは1~3個のアミノ基、水酸基などを炭素原子上に有していてもよい)、(iii)置換されていてもよいアミノ基、(iv)水酸基または $C_{1-6}$ アルコキシ基を示す。)で表される化合物などがあげられる。

上記のS-シアノ化およびアンモノリシスまたは加水分解により、〔図1〕に示される反応が起こると考えられる。

本発明の製造法で得られるK i S S-1ペプチドのC末端は、前記したようにアミド(-CONH<sub>2</sub>)、カルボキシル基、カルボキシレート(-COO-)、アルキルアミド(-CONHR)またはエステル(-COOR)であってもよく、なかでもアミド、カルボキシル基(-COOH)またはアルキルアミドが好ましく、特にアミドまたはアルキルアミドが好適である。具体的には、本発明の製造法で得られるK i S S-1ペプチドのC末端は、〔図1〕に示される-CO-Xであってよい。Xは $R^1-(NR^2)-$  (式中、各記号は前記と同意義を示す。)またはOHを示す。

上記 $C_{1-20}$ アルキルの例としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、sec-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、1-エチルペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノナニル、デ

カニル, ウンデカニル, ドデカニル, テトラデカニル, ペンタデカニル, ヘキサデカニル, ヘプタデカニル, オクタデカニル, ノナデカニルおよびエイコサニルなどがあげられる。

上記C<sub>3-8</sub>シクロアルキルの例としては、例えば、シクロプロピル, シクロブチル, シクロペンチル, シクロヘキシル, シクロヘプチル, シクロオクチルなどがあげられる。

上記C<sub>6-14</sub>アリールの例としては、フェニル, ナフチル, アンスリル, フェナンスリル, アセナフチレニルなどがあげられる。

上記C<sub>6-14</sub>アリール-C<sub>1-3</sub>アルキルの例としては、例えばベンジル, フェネチル, 3-フェニルプロピル, (1-ナフチル)メチル, (2-ナフチル)メチルなどがあげられる。

上記C<sub>1-6</sub>アルコキシの例としては、例えばメトキシ, エトキシ, プロポキシ, ブトキシ, ペンチルオキシ, ヘキシルオキシなどがあげられる。

#### 【0028】

上記(iii)の置換されていてもよいアミノの置換基の例としては、例えばアミノ酸, 2~10個のアミノ酸からなるペプチドなどがあげられる。

上記アミノ酸としては、L-体でもD-体でもよく、その例としては、例えば、Ala, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Met, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val などがあげられる。

上記ペプチドの例としては、例えば、H-D-Leu-Leu-Arg-Pro-NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, H-Val-Ala-Leu-D-Ala-Ala-Pro-Leu-Ala-Pro-Arg-OH などがあげられる。

上記した中でも、R<sup>2</sup>としては水素原子、R<sup>1</sup>としては水素原子またはC<sub>1-20</sub>アルキル基が好ましい。

該アンモノリシス反応において、アンモニアまたはアミノ化合物を用いた場合には、対応するアミド体を得られる。

#### 【0029】

切り出された目的ペプチドを単離するには、通常知られているペプチドの精製法に従えばよい。例えば、ゲル濾過法, イオン交換クロマトグラフィー, 高速液体クロマトグラフィー, アフィニティークロマトグラフィー, 疎水クロマトグラ

フィー、薄層クロマトグラフィー、電気泳動等を適宜組み合わせて行うことができる。

このようにして得られるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩は、公知の精製手段、例えば、抽出、塩析、分配、再結晶、クロマトグラフィーなどにより、反応溶液から単離・精製することもできるが、好ましい例として、例えば、S P - セファロース（ファルマシア バイオテク(株)）、D E A E - 5 P W（東ソー(株)）、あるいはS P - 5 P W（東ソー(株)）を介したイオン交換クロマトグラフィーなどによる精製法があげられる。

#### 【0030】

得られるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩は、必要によりこれを凍結乾燥により粉末とすることもできる。凍結乾燥に際しては、ソルビトール、マンニトール、デキストロース、マルトース、トレハロース、グリセロールなどの安定化剤を加えることができる。

#### 【0031】

本発明の方法で製造されるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩は滅菌水、ヒト血清アルブミン(H S A)、生理食塩水その他公知の生理学的に許容される担体と混合することができ、哺乳動物（例、ヒト）に対して非経口的に又は局所に投与することができる。たとえば、その1日投与量は1人あたり、約0.01mg-50mg、好ましくは、約0.1mg-10mgを、静注または筋注などにより非経口的に投与することができる。

本発明の方法で製造されるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩を含有する製剤は、塩、希釈剤、アジュバント、他の担体、バッファー、結合剤、界面活性剤、保存剤のような生理的に許容される他の活性成分も含有していてもよい。非経口的投与製剤は、滅菌水溶液又は生理学的に許容される溶媒との懸濁液アンプル、または生理学的に許容される希釈液で用時希釈して使用しうる滅菌粉末(通常ペプチド溶液を凍結乾燥して得られる)アンプルとして提供される。

#### 【0032】

本発明の製造法によって得られるK i S S - 1 ペプチドまたはその塩は癌転移抑制活性を有するため、あらゆる癌（例えば、肺癌、胃癌、肝癌、脾癌、大腸癌



、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等)の予防または治療薬として有用である。

また、KiSS-1ペプチドまたはその塩は胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胎状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬として有用である。

なお、本発明の製造法において、KiSS-1ペプチドを他の目的成熟ペプチドに代え、さらにN末端にシステインを有する低分子ペプチドを当該目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドに代えることによって、同様に、目的成熟ペプチドを製造することができる。

他の目的成熟ペプチドとしては、例えば、約10～200個、好ましくは約10～100個程度のアミノ酸残基を含有するペプチドなどが用いられる。

当該目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の部分ペプチドとしては、例えば、当該目的成熟ペプチドの前駆体蛋白質のC末端側の約10～50個、好ましくは約20～40個、さらに好ましくは約20～30個のアミノ酸残基を有する部分ペプチドが用いられる。

### 【0033】

本明細書および図面において、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基、その他に関し略号で表示する場合、それらはIUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature)による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を次にあげる。また、アミノ酸などに関し光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

A : アデニン

T : チミン

G : グアニン

C : シトシン

RNA : リボ核酸

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

Gly : グリシン

Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニールアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
Cys	: システイン
Asx	: アスパラギンまたはアスパラギン酸
Glx	: グルタミンまたはグルタミン酸
ATP	: アデノシン三リン酸

## 【 0 0 3 4 】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

## 〔配列番号： 1〕

K i S S - 1 ペプチドのアミノ酸配列を示す。

## 〔配列番号： 2〕

K i S S - 1 ペプチドをコードする DNA の塩基配列を示す。

## 〔配列番号： 3〕

低分子ペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：4]

低分子ペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：5]

融合蛋白質のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：6]

式 (I) で表される融合蛋白質をコードするDNAの断片の塩基配列 1 を示す。

[配列番号：7]

式 (I) で表される融合蛋白質をコードするDNAの断片の塩基配列 2 を示す。

[配列番号：8]

実施例 1 において K i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：9]

実施例 1 において K i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：10]

実施例 1 において K i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：11]

実施例 1 において K i S S - 1 ペプチドの構造遺伝子の調製に用いたオリゴマーの塩基配列を示す。

[配列番号：12]

実施例 1 において得られたDNA断片の塩基配列を示す。

[配列番号：13]

実施例 1 において得られたDNA断片の塩基配列を示す。

[配列番号：14]

実施例 1 において得られたDNA断片の塩基配列を示す。

[配列番号：15]

K i S S - 1 ペプチド成熟体のアミノ酸配列を示す。

後述の実施例1で得られた形質転換体 *Escherichia coli* M M 294 (DE3) / p T C 2 M e t C 24 - 1. 3 は、2001年12月10日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号 F E R M B P - 7823 として、2001年10月24日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686) の財団法人・発酵研究所 (I F O) に寄託番号 I F O 16717 して寄託されている。

【0035】

【発明の実施の形態】

以下に実施例をあげて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0036】

【実施例】

実施例1

C末端24アミノ酸付加K i S S - 1 ペプチドをコードするDNAの製造

(a) DNA断片の合成

【図1】に示す4種のDNA断片 (#1、#2 ; 5' リン酸化済, #3 ; 5' リン酸化済, #4 : キコーテック社) (配列番号 : 8 ~ 11) を用いてK i S S - 1 ペプチドのC末端に付加 (24アミノ酸残基) する遺伝子を調製した。

【0037】

(b) C末端付加用DNA断片の連結

上記a) で得られたDNA断片 #1 ~ #4 を合わせ40  $\mu$  l とした。この混合液を65℃で10分間保った後、室温まで徐冷しアニーリングを行った。このアニーリング液のうち10  $\mu$  l についてT4 DNA Ligase (宝酒造) を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液10  $\mu$  l に10倍濃縮添付Ligation バッファー2  $\mu$  l およびT4 DNA ライゲース1  $\mu$  l (350ユニット) を加えよく混合した後、16℃、17時間反応させ、ライゲーションを行った後、65℃

で5分間の熱処理を行った。この様にして得られたDNA断片をT4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）によるリン酸化を行った後、1.8%低融点アガロースゲル電気泳動により96bpのDNA断片（配列番号：12）をELUTIP Minicolumn（S&S社）を用いて抽出し、20 $\mu$ lのTE緩衝液に溶解し、以下の(c)に供した。

## 【0038】

## (c) KiSS-1 遺伝子とC末端付加用DNAフラグメントの連結

KiSS-1 ペプチド発現ベクターpTFC-KiSS-1をNde I（宝酒造）およびXmn I（NEB社）で37℃ 2時間消化した後、1.5%低融点アガロースゲル電気泳動により149bpのDNA断片（配列番号：13）をELUTIP Minicolumn（S&S社）を用いて抽出し、20 $\mu$ lのTE緩衝液に溶解した。このDNA断と上記b) で得られたDNA断片をライゲーションした。149bpのDNA溶液20 $\mu$ lと96bpのDNA溶液10 $\mu$ lに10倍濃縮添付 Ligation バッファ-3.5 $\mu$ lおよびT4 DNA ライゲース1.5 $\mu$ l（525ユニット）を加えよく混合した後、16℃、17時間反応させた。ライゲーションを行った後、65℃で5分間の熱処理を行った。このライゲーション液を用いて全量350 $\mu$ lでNde IおよびBamHI消化を1時間行った後、エタノール沈殿によってDNA断片（配列番号：14）を回収し、以下の(d)に供した。

## (d) C末端24アミノ酸付加KiSS-1 ペプチド発現ベクターの構築 [図2]

発現用ベクターpTCIIをNde IおよびBamHI（宝酒造）で37℃ 1時間消化した後、1%アガロースゲル電気泳動により4.6kbのDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社）を用いて抽出し、25 $\mu$ lのTE緩衝液に溶解した。このpTCIIのNde I-BamHI断片と上記c) で得られたDNA断片をT4 DNA Ligase（宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。

## 【0039】

この反応液を10 $\mu$ l用いて大腸菌JM109コンピテントセル（宝酒造）を形質転換し、10 $\mu$ g/mlのテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、

37℃で一晩培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニー選んだ。この形質転換体をLB培地で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit (キアゲン社) を用いてプラスミドpTC2MetC24を調製した。このC末端24アミノ酸付加KiSS-1構造遺伝子部分の塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル3100 DNAシーケンサーを用いて確認した。プラスミドpTC2MetC24で大腸菌MM294 (DE3) を形質転換し、C末端24アミノ酸付加KiSS-1タンパク質発現株M294 (DE3) / pTC2MetC24-1.3を得た。

## 【0040】

## (e) C末端24アミノ酸付加KiSS-1ペプチドの製造

MM294(DE3)/ pTC2MetC24-1.3 を5.0 mg/Lのテトラサイクリンを含むLB培地に1 L (1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム) を用いて2 L容フラスコ中で37℃、8時間振とう培養した。得られた培養液を19 Lの主発酵培地 (1.68%リン酸1水素ナトリウム、0.3%リン酸2水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.025%硫酸マグネシウム、0.02%消泡剤、0.00025%硫酸第1鉄、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.5%カザミノ酸) を仕込んだ50 L容発酵槽へ移植して、30℃で通気攪拌を開始した。培養液の濁度が500クレット単位になったところで、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドの最終濃度が12 mg/Lになるように添加し、さらに6時間培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、約430 gの湿菌体を取得し、-80℃で保存した。

## 【0041】

## 実施例2

実施例1で得た菌体70 gに7Mグアニジン塩酸塩、100 mM トリス緩衝液 1 mM EDTA (pH 8.0) 溶液 210 mlを加え、攪拌溶解を行った後、遠心分離 (8000 rpm、60分) を行った。上澄液を4.2 Lの50 mM トリス緩衝液、0.2M アルギニン pH 8.0、1 mM 還元型グルタチオン、0.1 mM 酸化型グルタチオンを含む溶液に希釈して低温室に一晩放置した。本溶液を1M尿素溶液で4倍に希釈し、酢酸でpH 6.0に調整し、50 mM MES-

NaOH緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した SP-Toyopearl 550C カラム (5 cm ID × 20 cm L、東ソー) に 750 mL/時間の流速で通液、吸着後、50 mM MES-NaOH緩衝液 0.2 M NaCl pH 6.0 で洗浄した後に 50 mM MES-NaOH緩衝液 0.5 M NaCl pH 6.0 で溶出した。この溶出液を蒸留水で 3 倍に希釈した後、50 mM MES-NaOH緩衝液 pH 6.0 で平衡化した SP-5PW (21.5 mm ID × 150 mm L、東ソー) に 5 mL/分の流速で通液、吸着した後 0-80% B (B = 1 M NaCl 50 mM MES-NaOH緩衝液 pH 6.0) の段階勾配で溶出を行い、KiSS-1-24 アミノ酸付加体画分をプールした。本溶出画分を 0.1% トリフルオロ酢酸で平衡化した C4P-50 (21.5 mm ID × 300 mm L、昭和電工) に通液、吸着した後 5 mL/分の流速で 20-70% B (B = 0.1% トリフルオロ酢酸 + 80% アセトニトリル) の段階勾配で溶出を行い、KiSS-1-24 アミノ酸付加体画分を得、凍結乾燥を行った。凍乾粉末を 0.1 M 酢酸 6 M 尿素溶液に溶解した後、DMA P-CN (1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate) 約 1.5 mg を加えて、室温で 15 分間反応した。反応終了後、反応液を 50 mM リン酸 1 カリウムで平衡化した Sephadex G-25 カラム (2.5 cm ID × 50 cm L、ファルマシア) に通液し、平衡化に用いた 50 mM リン酸 1 カリウムを 10 mL/分の流速で展開し、S-シアノ化された KiSS-1 ペプチド-24 アミノ酸付加体タンパク質画分を得た。この溶出液をマイクロコン (分画分子量 3 kDa: ミリポア社) で濃縮・脱塩を行い、KiSS-1-24 アミノ酸付加体の脱塩液を得た。この脱塩液に最終濃度 6 M となるように尿素を添加した後、さらに、3 M アンモニア濃度となるように 25% アンモニア水を加え、室温で 15 分間反応した。反応終了後、酢酸で pH 6.0 に調整し、KiSS-1 ペプチドを得た。この反応液を 50 mM リン酸 1 カリウムで平衡化した Sephadex G-25 カラム (2.5 cm ID × 50 cm L) に通液し、平衡化に用いた 50 mM リン酸 1 カリウムを 10 mL/分の流速で展開し、KiSS-1 ペプチド画分を得た。この画分を、0.1% トリフルオロ酢酸で平衡化した C4P-50 (21.5 mm ID × 300 mm L、昭和電工) に通液し、吸着、洗浄した後、5 mL/分の流速で 20-60% B (B: 80% アセト

ニトリル／ 0.1%トリフルオロ酢酸)の段階勾配で溶出を行い、K i S S - 1 ペプチド画分をプールした後、凍結乾燥を行い、K i S S - 1 ペプチド凍結乾燥粉末約 0.35mgを得た。

【 0 0 4 2 】

実施例 3 (K i S S - 1 ペプチドの特徴の決定)

a) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計(日立 L - 8 5 0 0 A Amino Acid Analyzer)を用いて決定した。その結果、K i S S - 1 ペプチドの DNA 塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した【表 1】。



【表1】

アミノ酸	1モル当たりの 残基数	KISS-1ペプチドの塩基配列 から予測される値
A s x	3. 4	4
Th r <sup>*)</sup>	0. 9	1
S e r <sup>*)</sup>	7. 1	8
G l x	7. 1	7
P r o	8. 2	8
G l y	5. 1	5
A l a	3. 0	3
C y s	0	0
V a l	1. 9	2
M e t	0	0
I l e	1. 0	1
L e u	5	5
T y r	1. 0	1
P h e	1. 9	2
H i s	1. 0	1
L y s	1. 0	1
A r g	3. 9	4
T r p	0. 4	1

酸加水分解(6N HCl-4%thioglycolic acid 24-48hr加水分解の平均値)

\*) 0時間に外挿した値

## 【0043】

## b) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー(PEアプライドバイオシステムズ モデル492)を用いて決定した。その結果、KISS-1ペプチドのDNA塩基配列から予想されるN末端アミノ酸配列と一致した【表2】。

【表 2】

## N末端アミノ酸配列分析

残基 No.	検出された PTH <sup>*)</sup> -アミノ酸	KISS-1 <sup>°</sup> フ <sup>°</sup> の塩基配列 から予測されるアミノ酸
1	G l y (56)	G l y
2	T h r (52)	T h r
3	S e r (41)	S e r
4	L e u (45)	L e u
5	S e r (33)	S e r
6	P r o (28)	P r o
7	P r o (34)	P r o
8	P r o (30)	P r o
9	G l u (14)	G l u
10	S e r (12)	S e r

100 pmol を用いた。

\*) フェニールチオヒダントイン。

## 【0044】

## 実施例 4 (生物活性測定)

実施例 2 で取得したヒト K i S S - 1 ペプチドを用いて、W O 99/33976 の実施例 3 に記載の方法 (細胞内カルシウムイオン濃度上昇活性) で活性を測定し、ヒト胎盤抽出液より精製した標品と同等の活性を有することを確認した。

## 【0045】

## 【発明の効果】

本発明の製造方法を用いると、例えば、癌 (例えば、肺癌、胃癌、肝癌、脾癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等)、さらには絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬などとして用いることができる K i s s -

1 ペプチドまたはその塩を工業的かつ大量に製造できる。

【 0 0 4 6 】

・【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例 1 で用いられた DNA フラグメントを示す。

【図 2】 実施例 1 で得られたプラスミド p T C 2 M e t C 2 4 の構築図を示す。

【配列表】

[SEQUENCE LISTING]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Method of Production for KiSS-1 peptide

<130> B02016

<160> 15

<210> 1

<211> 54

<212> PRT

<213> Human

<223> the C-terminus of the polypeptide is amide ( $-\text{CONH}_2$ ) form

<400> 1

Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln

1

5

10

15

Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly

20

25

30

Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn

35

40

45

Ser Phe Gly Leu Arg Phe

50

54

<210> 2

<211> 162

<212> DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

```

ggctacttctc tgtctccgcc gccggaatct tctggttctc gtcagcagcc gggctctgtct   60
gctccgcact ctcgtcagat cccggctccg caggggtgctg ttctggttca gcgtgaaaaa  120
gacctgccga actacaactg gaactctttc ggtctgcgtt tc                        162

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 3

Gly Lys Arg Glu Ala Ala Pro Gly Asn His Gly Arg Ser Ala Gly Arg

1                      5                      10                      15

Gly Trp Gly Ala Gly Ala Gly Gln

20                      24

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 72

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 4

```

ggtaaactg aagctgctcc gggtaccac ggtcgttctg ctggctgtgg ttgggggtgct   60
ggtgctggtc ag                                                         72

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 79

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 5

Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser Arg Gln Gln

1                      5                      10                      15

Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala Pro Gln Gly  
 20 25 30

Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr Asn Trp Asn  
 35 40 45

Ser Phe Gly Leu Arg Phe Cys Gly Lys Arg Glu Ala Ala Pro Gly Asn  
 50 55 60

His Gly Arg Ser Ala Gly Arg Gly Trp Gly Ala Gly Ala Gly Gln  
 65 70 75 79

<210> 6

<211> 237

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

ggtactttctc tgtctccgcc gccggaatct tctggttctc gtcagcagcc gggctctgtct 60  
 gctccgcact ctcgtcagat cccggctccg caggggtgctg ttctggttca gcgtgaaaaa 120  
 gacctgccga actacaactg gaactctttc ggtctgcgtt tctgcggtaa acgtgaagct 180  
 gctccgggta accacggtcg ttctgctggt cgtggttggg gtgctggtgc tggtcag 237

<210> 7

<211> 237

<212> DNA

<213> Human

<400> 7

ggtactttctc tgtctccgcc gccggaatct tctggttctc gtcagcagcc gggctctgtct 60  
 gctccgcact ctcgtcagat cccggctccg caggggtgctg ttctggttca gcgtgaaaaa 120  
 gacctgccga actacaactg gaactctttc ggtctgcgtt tctgtggtaa acgtgaagct 180  
 gctccgggta accacggtcg ttctgctggt cgtggttggg gtgctggtgc tggtcag 237

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

ctttcggctc gcgtttctgc ggtaaactgt aagctgctcc gg

42

<210> 9

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

gttaccgga gcagcttcac gttaccgca gaaacgcaga ccgaaag

47

<210> 10

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 10

gtaaccacgg tcgttctgct ggctgtggtt ggggtgctgg tgctggcag tgag

54

<210> 11

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 11

gacccctact gaccagcacc agcaccacca ccacgaccag cagaacgacc gtg

53

<210> 12

<211> 96

<212> cDNA

<213>

<400> 12

ctttcgggtct gcgtttctgc ggtaaactgt aagctgtctc gggtaaccac ggtcgttctg 60

ctggctcgtgg ttgggggtgct ggtgctggc agtgag 96

<210> 13

<211> 149

<212> cDNA

<400> 13

tatgggtact tctctgtctc cgccgccgga atcttctggt tctcgtcagc agccgggtct 60

gtctgtccg cactctcgtc agatcccggc tccgcagggt gctgttctgg ttcagcgtga 120

aaaagacctg ccgaactaca actggaact 149

<210> 14

<211> 245

<212> cDNA

<400> 14

tatgggtact tctctgtctc cgccgccgga atcttctggt tctcgtcagc agccgggtct 60

gtctgtccg cactctcgtc agatcccggc tccgcagggt gctgttctgg ttcagcgtga 120

aaaagacctg ccgaactaca actggaactc tttcgggtctg cgtttctgcg gtaaactgtga 180

agctgtctccg ggtaaccacg gtcgttctgc tggtcgtggt tgggggtgctg gtgctgggtca 240

gtgag 245

<210> 15

<211> 145

<212> PRT

<213> Human

<400> 15

Met Asn Ser Leu Val Ser Trp Gln Leu Leu Leu Phe Leu Cys Ala Thr

1                      5                      10                      15  
 His Phe Gly Glu Pro Leu Glu Lys Val Ala Ser Val Gly Asn Ser Arg  
                     20                      25                      30  
 Pro Thr Gly Gln Gln Leu Glu Ser Leu Gly Leu Leu Ala Pro Gly Glu  
                     35                      40                      45  
 Gln Ser Leu Pro Cys Thr Glu Arg Lys Pro Ala Ala Thr Ala Arg Leu  
                     50                      55                      60  
 Ser Arg Arg Gly Thr Ser Leu Ser Pro Pro Pro Glu Ser Ser Gly Ser  
                     65                      70                      75                      80  
 Arg Gln Gln Pro Gly Leu Ser Ala Pro His Ser Arg Gln Ile Pro Ala  
                     85                      90                      95  
 Pro Gln Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Leu Pro Asn Tyr  
                     100                      105                      110  
 Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Phe Gly Lys Arg Glu Ala Ala Pro  
                     115                      120                      125  
 Gly Asn His Gly Arg Ser Ala Gly Arg Gly Trp Gly Ala Gly Ala Gly  
                     130                      135                      140  
 Gln  
 145



【書類名】

図面

【図 1】

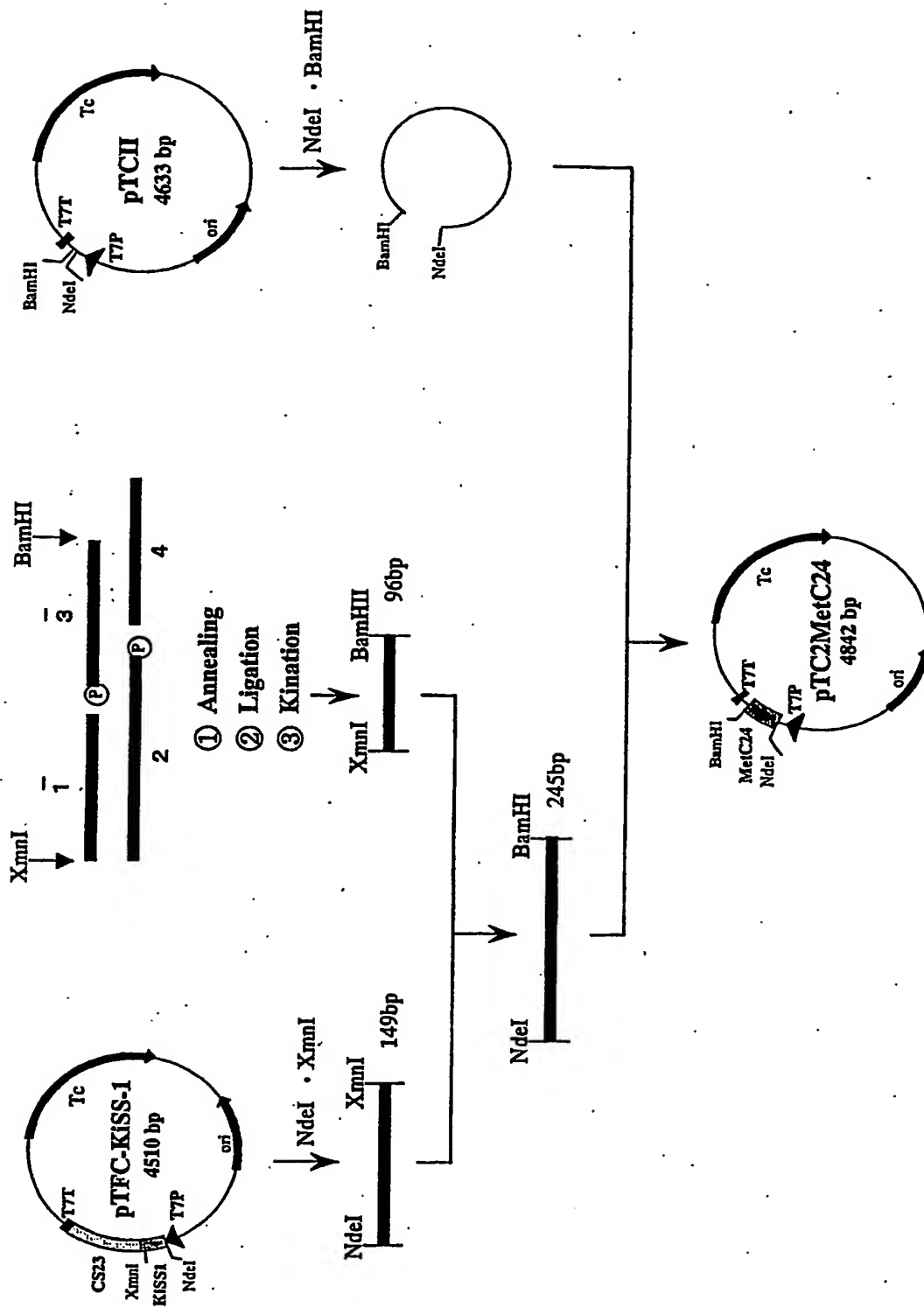
#1 5' -CTTCGGTCTGCGTTTCTGCGGTAAACGTGAAGCTGCTCCGG -3'

#2 5' P-GTTACCCGGAGCAGCTTCACGTTTACCGCAGAAACGCAGACCGAAAG -3'

#3 5' P-GTAACCACGGTCGTTCTGCTGGTCGTGGTTGGGGTGCTGGTGCTGGTCAGTGAG -3'

#4 5' -GATCCTCACTGACCAGCACCAGCACCCCAACCACGACCAGCAGAACGACCGTG -3'

【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 K i S S - 1 ペプチドまたはその塩を工業的かつ大量に製造するのに有利な製造法を提供する。

【解決手段】 N末端にシステインを有する低分子ペプチドのN末端にK i S S - 1 ペプチドを連結した融合蛋白質またはペプチドをシステイン残基のアミノ酸側のペプチド結合の切断反応に付すことを特徴とするK i S S - 1 ペプチドまたはその塩の製造法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002934]

1. 変更年月日

1992年 1月22日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

氏 名

武田薬品工業株式会社